

日本動物実験代替法評価センター（JaCVAM）平成 24 年度報告書

小島肇夫、西川秋佳

国立医薬品食品衛生研究所

安全性生物試験研究センター 日本動物実験代替法評価センター

要旨

Summary

In 2012, five test methods have been accepted by the JaCVAM regulatory acceptance board, including: 1) the reduced local lymph node assay (rLLNA), based on the reduction of LLNA, 2) LLNA: DA, a non-radioactive modification to the LLNA, which quantifies adenosine triphosphate (ATP) content via bio-luminescence as an indicator of lymphocyte proliferation; 3) the LLNA: BrdU-enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), a non-radioactive modification to the LLNA test method, which utilizes non-radiolabelled 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) in an ELISA-based test system to measure lymphocyte proliferation; 4) the fluorescein leakage assay for eye irritation testing; 5) the reconstructed human epidermis test method, EpiDerm and SkinEthics for *in vitro* skin irritation testing.

Furthermore, JaCVAM contributed to establish four OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) Test Guideline (TG) such as 1) TG No. 457: BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, 2) Revised TG No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists, 3) Revised TG No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion and 4) TG No. 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritant.

JaCVAM is currently coordinating and supporting the validation studies and peer review of several tests in accordance with the ICATM (International Cooperation on Alternative Test Methods) framework. The methods currently undergoing international peer review include the Bhas 42 cell transformation assay, the short time exposure (STE) assay for eye irritation testing, *in vivo* Comet assay for genotoxicity testing and reactive oxygen species (ROS) assay for phototoxicity testing. Additionally, JaCVAM is participating, along with several other international collaborators, in ongoing validation studies, which include the human cell line activation test (h-CLAT), the stably transfected transactivation assay (STTA) antagonist test for screening of endocrine disruptors, and the IL-8 Luc assay for the skin sensitization and Statens Serum Institut Rabbit Cornea (SIRC)-crystal violet staining (CVS) for the eye irritation this year.

1. 序論

日本動物実験代替法評価センター(JaCVAM : Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) の平成 24 年度の成果を年次報告としてまとめた。なお、本年度における JaCVAM の組織編制および国際協調などに変更されたことはない。

2. 成果

JaCVAM では、ICATM (International Cooperation on Alternative Test Methods) の協力を得て、眼刺激性、皮膚刺激性、感作性、光毒性試験などの代替法について、バリデーションや第三者評価を実施している。これらの情報は JaCVAM ホームページで逐次更新しており、興味のある方は最新情報を入手してほしい¹⁾。

2-1 JaCVAM 評価会議報告書

本年度は、①皮膚刺激性試験の代替法として ESAC (EURL ECVAM (European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing) Scientific Advisory Committee : ECVAM 科学顧問会議) により認証され、OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) TG (Test Guideline) No.439 (*in vitro* skin irritation assay)²⁾ に掲載された培養表皮モデル EpiDerm および SkinEthics に関する評価が終了した。これにより、以前に評価された EpiSkin に加え¹⁾、OECD TG No.439 に掲載された 3 表皮モデルの評価が終わったことになる。②日本が提案したリンパ節中の ATP 量の変化を指標とした皮膚感作性試験 LLNA (Local Lymph Node Assay:局所リンパ節法) : DA 法 (TG No.442A)²⁾ や、③BrdU の取り込みを指標とした LLNA : BrdU-ELISA 法 (TG No.442B)²⁾ の再評価が終了した。これらの試験法はすでに JaCVAM で評価が終了していたが¹⁾、評価内容と OECD TG との陽性判定基準の齟齬が問題視されていた。今回の評価は、OECD TG および NICEATM (National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) /ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) の評価資料に基づいてなされたことから³⁾、差異がなくなった。今後ユーザーを混乱させないためにも、JaCVAM のみによる第三者評価報告書のみを用いて、JaCVAM の各試験法評価委員会が資料をまとめることを止め、OECD による TG 案の進行および関連資料をもとに、それらの資料を用いて JaCVAM 評価会議が日本の法律やガイドラインに基づいた行政的な受入れについて議論するという形式が妥当であると考えた。この良い例が④皮膚感作性試験 reduced LLNA (rLLNA)²⁾、⑤眼刺激性試験 フルオレセイン漏出試験である²⁾。rLLNA に関しては TG 成立一年後に、フルオレセイン漏出試験は半年後に評価会議での評価を終了できた。

2-2 OECD テストガイドライン

2012 年 OECD はヒト健康に関する 5 つのテストガイドラインを成立させた (400 番台のテストガイドライン)²⁾。そのうち、4 つに JaCVAM は関与した。①日本もバリデーションに協力した内分泌かく乱スクリーニング エストロジェンアゴニスト&アンタゴニスト法 BG1Luc アッセイ (TG No. 457: BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists) が成立するとともに、2009 年に成立していた TG No. 455 (安定にトランスフェクトされたヒトエストロゲン受容体- α の転写活性化アッセイ アゴニスト法) に BG1 Luc アッセイも加えられ、②改定 TG No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists Test として成立した。③眼刺激性試験改定 TG No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion は peer review の段階で残留農薬研究所 小坂忠司氏が協力した。④Test No. 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritant については、バリデーション報告書作成の際に、大野泰雄氏が協力した。TG の中にも、JaCVAM が協力して作成したと記載されている。

なお、皮膚刺激性試験代替法 LabCyte EPI-MODEL に関しては、OECD TG439 への加筆が 2013 年の 4 月に決定した³⁾。

2-3 皮膚感作性試験代替法および光毒性試験代替法を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンスについて

皮膚感作性試験代替法および光毒性試験代替法について、その利用促進を図るため、厚生労働省審査管理課は、それぞれ化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンスを作成し、事務連絡として周知した。

- ① 皮膚感作性試験代替法としてのLLNAを化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンス
- ② 光毒性試験代替法としての *in vitro* 3T3 NRU 光毒性試験を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンス

2-4 国際的な第三者評価

株式会社花王で開発された眼刺激性試験代替法 細胞毒性試験 STE (Short Time Exposure : STE) については、2008-2009 年に日本動物実験代替法学会で実施されたバリデーションおよび 2010 年の JaCVAM 追加バリデーションを経て⁴⁾、OECD の work plan に加えられている⁵⁾。現在、ICCVAM の協力を得て³⁾、国際的な第三者評価が実施されている。

イニシエーションに加え、プロモーターも検出できる形質転換試験法 Bhas42 アッセイについては、独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) プロジェクトでバリデートされ、OECD に TG として申請された⁵⁾。EURL ECVAM にて評価が終了した。

コメットアッセイについては、日本環境変異原学会/哺乳類変異原性(MMS)研究会、欧米の研究機関と協力して国際的なバリデーションを進めてきた。*In vivo* 試験に関しては、バリデーション報告書を 2012 年 8 月末に、OECD に提出し⁵⁾、専門家グループで評価が終了した。

活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) を指標とした光毒性試験について、日本製薬工業会の支援を受け、バリデーションが実施された。JaCVAM での第三者評価が進んでいる。

2-5 バリデーション

皮膚感作性試験代替法においては、h-CLAT (Human Cell Line Activation Test) のバリデーション研究が EURL ECVAM 中心に行われてきたが、昨秋実験が終了した。東北大 相場らの開発した IL-8 Luc アッセイについて、経済産業省主導で実施中のバリデーションを支援した。

住友化学が開発した生殖発生毒性スクリーニング Hand-1 Luc assay のバリデーションが 2013 年 2 月に開催されたことから、経済産業省主導で開始されたばかりのこのバリデーションを支援した。

眼刺激性試験代替法 細胞毒性試験 SIRC-CVS (クリスタルバイオレット染色法) については、国立医薬品食品衛生研究所主導のバリデーションを実施中である。

安定にトランスフェクトされたヒトエストロゲン受容体- α の転写活性化アッセイ アゴニスト法 TG455 にアンタゴニストの評価系も加えるべく、バリデーションが実施され、実験が 2013 年 2 月に終了した³⁾。

2-6 ICATM 対応試験

ICATM で協力している試験法のバリデーションおよび第三者評価の表 1 に示す。EURL ECVAM のバ

リレーションが中心であり、眼刺激性試験代替法である培養角膜モデルを用いた試験法、皮膚感作性試験代替法である h-CLAT および MUSST、トキシコキネティック試験として、*in vitro* 肝生体内変化 – CYP 誘導 – Hepa RG 凍結ヒト肝細胞、遺伝毒性試験として培養表皮モデルを用いた小核試験のバリデーション、内分泌かく乱スクリーニングとして MELN®：安定にトランスフェクトされたヒトエストロゲン転写活性化アッセイ ヒトエストロゲン転写活性化アッセイ、アゴニスト&アンタゴニスト法のバリデーションが進んでいる。

さらに、皮膚感作性試験代替法として DPRA (Direct Peptide. Reactivity Assay) および Keratinosense、急性経口毒性として、*In vitro* 細胞毒性試験 (3T3NRU)の第三者評価がなされた。

3. JaCVAM の外部評価

JaCVAMの運営とその計画および成果について、1年に1回以上の頻度で運営委員会から報告を受け、それらについて審議し、助言する顧問会議を持つ点はEURL ECVAM、ICCVAMと同様である。

4. 総括

本年度は、4つ試験法に関する OECD テストガイドライン成立に貢献するとともに、JaCVAM 評価会議にて5つの試験法の評価を終了できた。今後も本年度のような成果を継続させていくことを意識していきたい。

謝辞

すべての JaCVAM 協力者の皆様にこの場をお借りして感謝致す。本活動は、厚生労働本省試験研究所試験研究費「健康安全確保のための研究費：国際的動向に対応する新規安全性試験法およびその評価手法の開発」の支援を受けて実施された。

参考文献

- 1) JaCVAM (2012) Available at: <http://jacvam.jp/>
- 2) OECD test guideline (2012) Available at:
http://www.oecd.org/document/40/0,3746,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html
- 3) OECD draft test guideline (2012) Available at:
http://www.oecd.org/document/55/0,3343,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html
- 4) OECD Series on Testing and Assessment / Adopted Guidance and Review Documents (2012) available at :
http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html
- 5) OECD WORK PLAN FOR THE TEST GUIDELINES PROGRAMME (2011) Available at:
[http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/TG\(2011\)47&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/TG(2011)47&doclanguage=en)